

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Veronika Kacerovská

POROVNÁNÍ METOD PRO STANOVENÍ IBUPROFENU V LÉČIVÝCH PŘÍPRAVCÍCH

The Comparison of Methods for the Determination of Ibuprofen in
Medical Preparations

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, 25. května 2015

Poděkování

Ráda bych poděkovala mému vždy vlídnému školiteli RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za odbornou pomoc a cenné rady, jež mi poskytoval během vypracovávání této bakalářské práce. Rovněž děkuji svým rodičům, sestře a blízkým přátelům za veškerou podporu a pomoc, které se mi od nich dostávalo.

Abstrakt

Tato bakalářská práce je určena k porovnání a zhodnocení čtyř vybraných analytických metod pro stanovení obsahu ibuprofenu v lékových formách z hlediska jejich finanční a časové náročnosti, pravdivosti a preciznosti. Byly vybrány čtyři analytické metody: acidobazická titrace s vizuální indikací konce titrace, UV spektrofotometrie, voltametrie a spektrofleurimetrie. Dále byly zvoleny čtyři léčivé přípravky: potahované tablety Brufen 400 mg, čípky Nurofen 60 mg, Dolgit gel 150 g a Dolgit krém 150 g. Nejpreciznější hodnoty poskytla acidobazická titrace a spektrofleurimetrie. Naopak nejméně precizní bylo voltametrické stanovení u vzorku potahované tablety Brufen a UV spektrofotometrické a voltametrické stanovení u vzorku Dolgit krému. Výsledky spektrofleurimetrického stanovení, voltametrického stanovení a UV spektrofotometrického stanovení se shodly s deklarovanou hodnotou, tj. povoleným rozmezím obsahu ibuprofenu v lékových formách. Z finančního hlediska byla nejvýhodnější spektrofleurimetrie, naopak nejnákladnější bylo voltametrické stanovení. Časově nejnáročnější bylo voltametrické stanovení, naopak nejrychlejší metodou byla acidobazická titrace.

Klíčová slova: ibuprofen, acidobazická titrace, UV spektrofotometrie, voltametrie, spektrofleurimetrie

Obsah

1	Cíl bakalářské práce	7
2	Teoretická část	8
2.1	Ibuprofen	8
2.1.1	Fyzikální a chemické vlastnosti ibuprofenu	8
2.1.2	Syntéza ibuprofenu	9
2.1.3	Stabilita a rozklad ibuprofenu	11
2.1.4	Farmakologie ibuprofenu	11
2.1.5	Lékové formy ibuprofenu a jeho dávkování	13
2.2	Metody stanovení ibuprofenu	14
2.2.1	Acidobazická titrace ibuprofenu	15
2.2.2	UV spektrofotometrické stanovení ibuprofenu	15
2.2.3	Voltametrické stanovení ibuprofenu	16
2.2.4	Spektrofluorimetrické stanovení ibuprofenu	16
3	Experimentální část	17
3.1	Analyzované léčivé přípravky	17
3.2	Použité chemikálie	17
3.3	Pracovní postupy a vyhodnocení použitých metod	18
3.3.1	Acidobazická titrace ibuprofenu	18
3.3.2	UV spektrofotometrické stanovení ibuprofenu	19
3.3.3	Voltametrické stanovení ibuprofenu	21
3.3.4	Spektrofluorimetrické stanovení ibuprofenu	23
3.4	Statistické zpracování naměřených hodnot	25
4	Výsledky a diskuze	26
4.1	Acidobazická titrace ibuprofenu	26
4.2	UV spektrofotometrické stanovení ibuprofenu	27
4.3	Voltametrické stanovení ibuprofenu	30
4.4	Spektrofluorimetrické stanovení ibuprofenu	32
4.5	Vyhodnocení pravdivosti, preciznosti, finanční a časové náročnosti vybraných metod	35
5	Závěr	39
	Literatura	40

Seznam použitých zkratek a symbolů

A_{264}	absorbance při 264 nm
c	molární koncentrace [mol dm^{-3}]
f	faktor odměrného roztoku
m	hmotnost [g]
M	molární hmotnost [g mol^{-1}]
n	počet měření
$\text{p}K_{\text{a}}$	disociační konstanta kyseliny
$T_{0,5}$	biologický poločas [s, min, hod, rok]
V	objem [ml]
w	hmotnostní zlomek, resp. obsah analytu v analyzovaném vzorku [%]

1 Cíl bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce je porovnat čtyři vybrané analytické metody (acidobazická titrace, UV spektrofotometrie, voltametrie a spektrofluorimetrie) pro stanovení obsahu ibuprofenu ve čtyřech různých lékových formách (potahovaných tabletách, čípcích, gelu a krému) z hlediska jejich pravdivosti, preciznosti, finanční a časové náročnosti.

2 Teoretická část

2.1 Ibuprofen

Ibuprofen patří k nejzajímavějším a v posledních třiceti až čtyřiceti letech nejpoužívanějším nesteroidním antiflogistikům. Řadí se mezi deriváty propionové kyseliny a je používán k tlumení bolesti, zánětů a snižování horečky. Díky dobré snášenlivosti nahradil léky na bázi acetylsalicylové kyseliny a indometacinu [1, 2].

Ibuprofen byl objeven v padesátých letech dvacátého století, kdy farmakolog Stewart Adams, vedoucí vědeckého výzkumu při společnosti Boots Pure Drug Company, spolu s chemikem Johnem Nicholsonem pracovali na vývoji protizánětlivého léku proti revmatické artritidě. Výslednou látkou byl ibuprofen, který tišil bolest silněji než aspirin a s menšími vedlejšími účinky. V roce 1962 byl ibuprofen patentován [3].

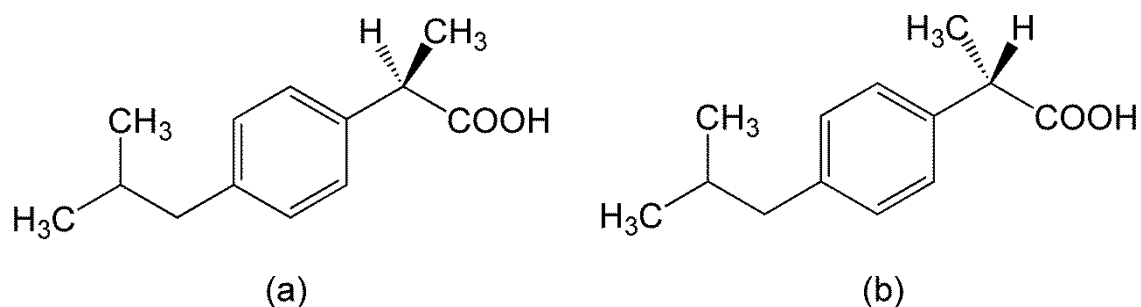
2.1.1 Fyzikální a chemické vlastnosti ibuprofenu

Ibuprofen (obr. 2.1), systematicky (*RS*)-2-(4-isobutylfenyl)propionová kyselina, je bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky zcela nerozpustné ve vodě, ale dobře rozpustné v acetonu, etheru, methanolu a v dichlormethanu. Také se rozpouští ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů. Jeho molární hmotnost je $206,28 \text{ g mol}^{-1}$, sumární vzorec $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$ a teplota tání 75°C až 78°C [4]. Jde o látku kyselé povahy s $\text{p}K_{\text{a}1} = 4,4$ a $\text{p}K_{\text{a}2} = 5,2$ při 25°C .

Ibuprofen je opticky aktivní sloučenina s (*R*)- a (*S*)-izomery, ale (*S*)-izomer, pojmenován jako dexibuprofen, je více biologicky aktivní. Předpokládá se, že enzym α -methylacyl-CoA racemasa transformuje (*R*)-izomer na (*S*)-izomer. Proto se v běžných přípravcích ibuprofenu tato látka nachází jako racemická směs [2, 5].

Ibuprofen je tvořen benzenovým jádrem, navázanou isobutylovou skupinou a propylkarboxylovou skupinou [4]. Na benzenový kruh lze vázat do polohy *para* a *meta* lipofilní skupiny (například aryl, thiofen či heteroaryl), což vede ke zvýšení protizánětlivých účinků látky.

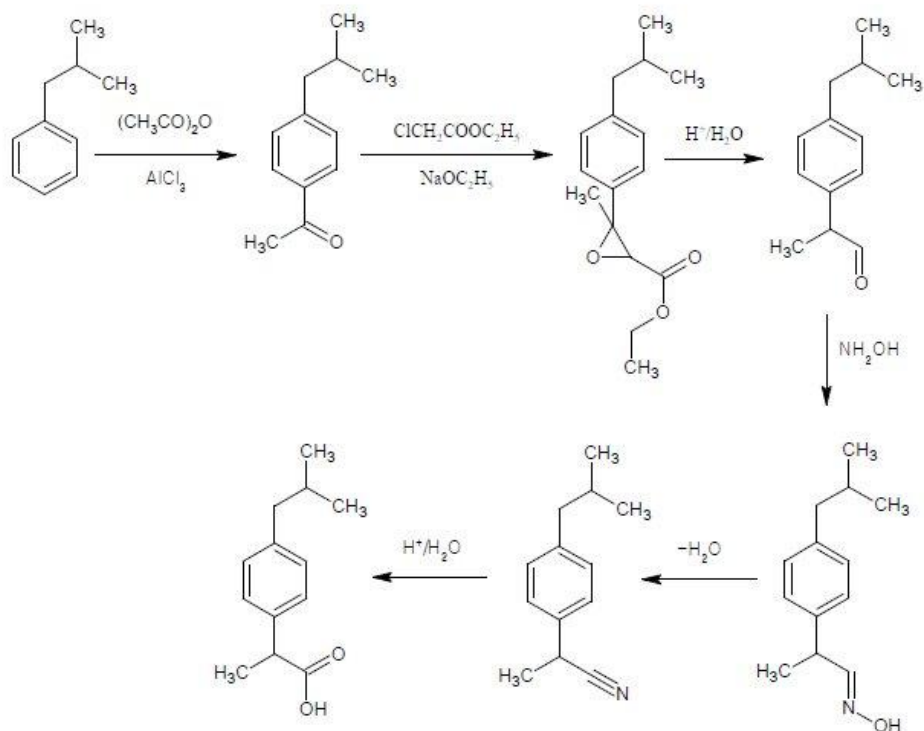
Pro rychlejší nástup účinku ibuprofenu (až o 15 minut) je často modifikován na sůl ibuprofenu s lysinem, která je dobře rozpustná ve vodě díky polární aminokyselině [6].



Obr 2.1 Chemická struktura stereoizomerů ibuprofenu: (a) (*S*)-izomer, (b) (*R*)-izomer.

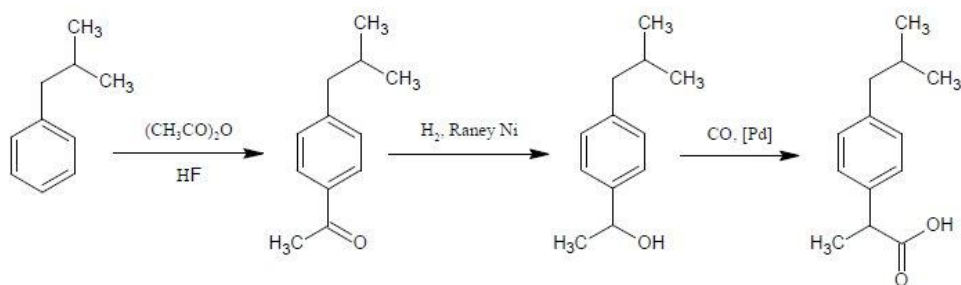
2.1.2 Syntéza ibuprofenu

Originální syntéza a užití racemického ibuprofenu bylo patentováno v šedesátých letech dvacátého století firmou Boots Pure Drug Company [2, 7]. Tento patent obsahuje šest způsobů syntézy racemické (4-izobutylfenyl)propionové kyseliny. Nejběžnější metodou (obr. 2.2), uvedenou v tomto patentu, je šestistupňová syntéza založená na Friedel-Craftsově acetylaci 4-isobutylbenzenu acetanhydridem za vzniku fenonu, který reaguje s ethylesterem chlorovodíkové kyseliny za přítomnosti epoxidu sodného a vzniká glycidester. Tato reakce je označovaná jako Darzensova reakce. Z glycidesteru, po zmýdelnění a otevření epoxidového kruhu, eliminací vody a následné dekarboxylaci, vzniká aldehyd. Karbonylová skupina aldehydu reaguje s hydroxylaminem a následně probíhá dehydratace vzniklého oximu na nitril. Nitril je zmýdelněn a vzniká karboxylová skupina.



Obr. 2.2 Šestistupňová syntéza ibuprofenu podle [7]

V roce 1997 byla firma BASF oceněna Americkou agenturou pro ochranu životního prostředí za Zelenou chemii, jelikož se zasadila za snížení ekologického dopadu výroby ibuprofenu tím, že šestistupňovou syntézu zkrátila na syntézu třístupňovou (obr. 2.3) [8].



Obr. 2.3 Třístupňová syntéza ibuprofenu podle [8].

Dnes je přímo vyráběn (S)-izomer 2-(4-isobutylfenyl)propionové kyseliny. Většina těchto výrob je založena na dělení racemické směsi přes diastereoizomery substituované oxazolidin-2-ony *N*-acylované (4-isobutylfenyl)-propionovou kyselinou [9]. Také se využívá dělení diastereoizomerních esterů 1,2-O-isopropyliden- α -D-glukofuranosy a (4-isobutylfenyl)propionové kyseliny, deriváty jsou poté hydrolyticky převedeny na opticky čisté produkty [10, 11].

2.1.3 Stabilita a rozklad ibuprofenu

Stabilitu ibuprofenu může ovlivňovat přítomnost nečistot, jimiž mohou být vedlejší produkty syntézy ibuprofenu, zbytky reakčních činidel a v případě léčivých přípravků pomocné substance. Mezi nejčastěji vyskytované nečistoty ibuprofenu patří (2*RS*)-2-(3-isobutylfenyl)propanová kyselina, (2*RS*)-2-(4-butylfenyl)propanová kyselina, (2*RS*)-2-(4-isobutylfenyl)propanamid, (2*RS*)-2-tolylpropanová kyselina a 1-(4-isobutylfenyl)ethan-1-on. Tyto nečistoty se stanovují pomocí plynové a kapalinové chromatografie. Mohou způsobit rozklad ibuprofenu nebo změnit jeho teplotu tání.

Dalšími faktory, které ovlivňují stabilitu ibuprofenu a podporují jeho degradaci na jiné produkty, jsou látky kyselé a zásadité povahy, oxidativní a teplotní stres, vlhkost a záření. Tyto faktory jsou dány skladováním, interakcí substancí v lékových formách nebo dobou expirace [12, 13].

2.1.4 Farmakologie ibuprofenu

Ibuprofen, v léčivých přípravcích známý jako APO-Ibuprofen, Brufen, Dolgit, Nurofen je látka, která se řadí mezi nesteroidní protizánětlivé látky, označované také jako antiflogistika. V nižších dávkách má převážně protizánětlivé účinky, proto se využívá k léčbě zánětlivých a degenerativních kloubních chorob. Při vyšších dávkách má spíše analgetické účinky a je užíván proti mírným a středně silným bolestem, jako bolest zubů, dysmenorhea a pooperační bolesti. Ibuprofen je i účinným antipyretikem, používající se při horečnatých stavech [1].

Hlavním mechanismem účinku ibuprofenu je inhibice enzymu cyklooxygenasy (COX), který se podílí na syntéze prostaglandinu v řadě lidských tkání. Enzym cyklooxygenasa se v lidském těle nachází ve dvou izoformách. COX-1 je forma konstitutivní a forma COX-2 je forma inducibilní, která tvoří prostaglandiny v místě zánětu, ale při její inhibici není zabráněno tvoření prostaglandinu izoformou COX-1. Při neselektivní inhibici obou izoform dochází k poklesu zánětlivých projevů, ale také i k projevu nežádoucích účinků z důvodu inhibice COX-1, protože inhibitory COX-1 se vyznačují většími nežádoucími účinky v oblasti gastrointestinálního ústrojí a ledvin. Nepřítomnost prostaglandinů také narušuje integritu žaludeční sliznice a negativně ovlivňuje průtok tekutin ledvinami. Ve vyšších dávkách dochází také k inhibici řady dalších enzymů a jejich ovlivnění je příčinou některých nežádoucích účinků [14–16].

I když je ibuprofen považován za dobře snášenou látku u pacientů trpících gastroduodenálními vředy a je používán u pacientů nesnášejících salicyláty, může způsobovat nežádoucí účinky. Nejčastějším nežádoucím účinkem ibuprofenu je vyvolání precitlivění gastrointestinálního traktu, které může být doprovázeno krvácením, zácpou, průjmem nebo anemií. S inhibicí tvorby prostaglandinů souvisí blokáda funkce krevních destiček, v nichž je zabráněno tvorbě tromboxanu A₂, který je mohutným agregačním činidlem. Může způsobovat prodloužení krvácení a výjimečně i změny renálních funkcí. Po podání vysokých dávek může dojít k selhání ledvin, jelikož ibuprofen snižuje krevní průtok ledvinami a glomerulární filtraci. Také jeho časté užívání může způsobit oční problémy, bolesti hlavy nebo zvýšit hladinu jaterních enzymů [1, 17].

Ibuprofen může také ovlivňovat účinky jiných současně používaných látek a naopak. Acetylsalicylová kyselina, warfarin, lék ovlivňující srážlivost krve, léky působící proti shlukování krevních destiček, kortikoidy a léky k léčbě deprese, zvyšují riziko vzniku nežádoucích účinků v oblasti zažívacího ústrojí včetně krvácení a vzniku žaludečního vředu. Ibuprofen může snižovat účinky močopudných léků a léků užívaných při léčbě vysokého krevního tlaku. Také může ovlivnit účinky chinolonových antibiotik (jako jsou nolicin, ofloxin a ciplox) tím, že může zvýšit riziko vzniku křečí, které tyto antibiotika mohou způsobit [18].

Farmakokinetika ibuprofenu závisí na zdravotním stavu jedince, na dávce látky a také na způsobu podání. Po perorálním podání terapeutické dávky ibuprofenu následuje rychlá absorpce ibuprofenu z gastrointestinálního traktu. Absorpce není ovlivněna ani potravou ani antacidy. Maximální koncentrace ibuprofenu v krvi je po 2 až 4 hodinách [1]. V krvi je až 99 % ibuprofenu vázáno na plazmatické proteiny, proto má malý distribuční objem, který činí 0,10 až 0,17 l/kg. Terapeutická plazmatická koncentrace ibuprofenu je 30 mg/l. Biologický poločas ibuprofenu jsou dvě hodiny. Více než 60 % podané dávky je vyloučeno močí, buď v podobě metabolitů, nebo v nezměněné formě. Zbytek je vyloučen stolicí. Ibuprofen podléhá biotransformaci primárně v játrech, kde je hydroxylován nebo karboxylován a poté konjugován s endogenními sloučeninami na konjugáty, které se snadněji vylučují, na sloučeniny polárnější. Majoritním metabolitem ibuprofenu je konjugovaná 2-[4-(karboxypropyl)fenyl]propionová kyselina. Biotransformaci v játrech řídí komplex CYP2C9, což je skupina hemoproteinových enzymů, které se podílejí na oxidativních procesech. Celkové vyloučení ibuprofenu z organismu trvá 24 hodin [4, 18].

2.1.5 Lékové formy ibuprofenu a jeho dávkování

Jelikož se ibuprofen nachází na trhu v několika lékových formách, existuje zde i různý způsob podání. Ibuprofen se podává nejčastěji perorálně v podobě tablet, šumivých granulí, tobolek nebo sirupu. Dále pak rektálně v podobě čípků, parenterálně v podobě infuzí. Účinné je i lokální použití ve formě gelů či krémů. Jde o lék patřící k volně prodejným [17].

Tablety, tobolky a šumivé granule obsahují nejčastěji 200, 400 nebo 600 mg ibuprofenu. Sirupy obsahují 20 mg/ml ibuprofenu, krémy a gely 50 mg/g ibuprofenu a čípky 60 nebo 125 mg.

Nejčastěji se ibuprofen podává v dávce 200 až 400 mg třikrát až čtyřikrát denně, avšak záleží na věku a tělesné hmotnosti jedince. Při dávce 150 mg/kg hmotnosti dospělého jedince nevyvolá ibuprofen závažně toxické účinky. Byla přežita i dávka několik desítek gramů ibuprofenu u dospělého, ale běžná denní

dávka je 1,2 až 1,8 g u dospělého, což bývá často přesahováno. U dětí je tato dávka mnohem menší a to 20 až 30 mg/kg hmotnosti [1, 3, 15, 17].

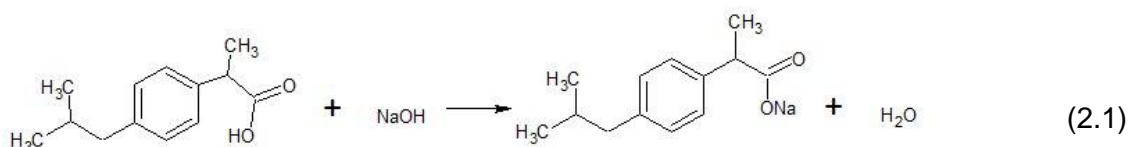
2.2 Metody stanovení ibuprofenu

Nejčastěji používanými metodami pro stanovení ibuprofenu jsou ty, které jsou časově nenáročné a na provedení jednoduché. Jde o UV/VIS spektrofotometrii a acidobazickou titraci hydroxidem sodným v methanolu s vizuálním koncem titrace za přítomnosti acidobazického indikátoru. Časově náročnější, ale často využívaná, je vysokotlaká kapalinová chromatografie s reverzní fází, která je vhodná zvláště k analýze metabolitu ibuprofenu nebo u multivzorkové analýzy. U vysokotlaké kapalinové chromatografie pro stanovení ibuprofenu je nejčastěji užíván UV spektrofotometrický nebo fluorimetrický detektor. Další užívanou metodou je titrace tetrabutylamoniem v acetonitrilu, kde je detekován konec titrace potenciometricky [4, 7, 19, 20]. Tenkovrstevná chromatografie, kterou lze separovat i enantiometry ibuprofenu za přítomnosti L-argininu v mobilní fázi acetonitril-methanol-voda v poměru 5:1:1 (cit. [21]). Dále méně častějšími jsou infračervená spektrofotometrie, kapilární elektroforéza, izotachoforéza, plynová chromatografie s hmotnostním či plamenově-ionizačním detektorem a termogravimetrie [22]. Mezi elektrochemické metody lze zahrnout diferenční pulzní voltametrii na bórem modifikované diamantové elektrodě [23] nebo na vícevrstvých uhlíkových nanotrubicích na bázi kompozitních elektrod [24]. U environmentálních analýz je často využíváno preanalytických kroků, účinná a častá je extrakce na pevné fázi [25].

Pro stanovení ibuprofenu v různých lékových formách byly pro účely této bakalářské práce vybrány čtyři analytické metody, acidobazická titrace, UV spektrofotometrie, voltametrie a spektrofluorimetrie.

2.2.1 Acidobazická titrace ibuprofenu

Acidobazická titrace, neutralizační odměrná analýza, je určena k stanovení kyselých kationtů zásadami nebo k stanovení zásaditých aniontů kyselinami. Produktem této reakce je sůl kyseliny a zásady a dále pak voda [26]. Acidobazická titrace je lékopisnou metodou pro stanovení ibuprofenu v lékových formách. Jde o alkalimetrii, kdy je stanovena slabá kyselina silnou zásadou. Ibuprofen je zde donorem protonu a hydroxid sodný je zde akceptorem protonu. Odměrný roztok hydroxidu sodného je standardizován na primární standard hydrogenšťavelan sodný [4]. Při reakci vzniká sodná sůl ibuprofenu a voda podle následující reakce



Bod ekvivalence lze určit instrumentálně zjištěním změny fyzikální veličiny v závislosti na objemu odměrného činidla, nebo jako v případě této titrace pomocí vhodného acidobazického indikátoru. Fenolftalein je vhodný acidobazický indikátor pro stanovení ibuprofenu acidobazickou titrací. Jeho pK_a je 9,4 a barevný přechod při nadbytku hydroxidu sodného z čiré na fialovou barvu nastává v rozmezí pH 8,0–9,8 (cit. [4, 26]).

2.2.2 UV spektrofotometrické stanovení ibuprofenu

Stanovení obsahu ibuprofenu ve vzorku UV spektrofotometrií metodou standardního přídávku je založeno na absorpci elektromagnetického záření. Podle Britského lékopisu 2009 [4] jsou absorpční maxima ibuprofenu při 265 a 273 nm.

2.2.3 Voltametrické stanovení ibuprofenu

Voltametrické stanovení ibuprofenu ve vzorku bylo provedeno diferenční pulzní voltametrií na rotující diskové platinové elektrodě, na níž je ibuprofen v prostředí 0,1M chloristanu sodného v acetonitrilu redukován při potenciálu asi $-0,8$ V (proti SAE). Elektrodová reakce není zcela objasněna [27].

2.2.4 Spektrofluorimetrické stanovení ibuprofenu

Stanovení obsahu ibuprofenu v různých lékových formách spektrofluorimetrií metodou standardního přídávku je založeno na intenzitě emitovaného záření. Molekula ibuprofenu emituje záření při přechodu z excitovaného stavu jedním či více spontánními energetickými přechody. Buzení molekuly ibuprofenu nastává při vlnové délce 263 nm, maximum emise záření nastává při 288 nm (cit. [28]).

3 Experimentální část

3.1 Analyzované léčivé formy

Pro stanovení obsahu ibuprofenu byly použity následující léčivé přípravky:

- potahované tablety Brufen 400 mg, Abott GmbH & CO.KG, Německo, šarže 40739PC, použitelné do 03/17.
- gel Dolgit 150 g, Pharmaceuticals, Německo, šarže 304764, použitelné do 03/2016.
- krém Dolgit 150 g, Pharmaceuticals, Německo, šarže 402094, použitelné do 01/2017.
- čípky Nurofen 60 mg, Reckitt Benckiser Healthcare, Velká Británie, šarže 1402815, použitelné do 02/16.

3.2 Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie byly analytické čistoty (nebo vyšší): aceton (Penta), acetonitril (Sigma-Aldrich), amoniak 25 % (Lach-ner), dihydrát šťavelové kyseliny (Lach-ner), hydroxid sodný (Penta), chlorid vápenatý (Lach-ner), chloristan sodný (Sigma-Aldrich), methanol (Sigma-Aldrich).

Ke kalibračním měřením byl použit standard ibuprofenu ≥ 98 % (GC) od firmy Sigma-Aldrich.

3.3 Pracovní postupy a vyhodnocení použitých metod

3.3.1 Acidobazická titrace ibuprofenu

Příprava roztoků

Odměrný roztok 0,1M hydroxidu sodného byl připraven odměřením 5,5 ml 48 % hydroxidu sodného o hustotě $1,510 \text{ g cm}^{-3}$ a doplněním destilovanou vodou na objem 1 l.

Připravený 0,1M roztok hydroxidu sodného byl standardizován na dihydrát šťavelové kyseliny za vizuální indikace methyloaranží. Do titrační baňky bylo kvantitativně odváženo asi 0,025 g dihydrátu šťavelové kyseliny přesně, rozpuštěno v asi 50 ml destilované vody a přidány tři kapky methyloaranže. Obsah titrační baňky byl titrován 0,1M hydroxidem sodným z červeného do oranžového zabarvení indikátoru. Těsně před bodem ekvivalence bylo přidáno 0,2 ml 20 % chloridu vápenatého a obsah titrační baňky byl dotitrován z červeného až do žlutého zabarvení do okamžiku, kdy jediná kapka hydroxidu sodného dokončila barevnou změnu. Ze známé stechiometrie reakce a z dané spotřeby titračního činidla byl vypočítán faktor připraveného 0,1M odměrného roztoku hydroxidu sodného.

Stanovení

Stanovení obsahu ibuprofenu ve čtyřech lékových formách bylo provedeno podle postupu, který je uveden v *Českém lékopisu 2009* [12].

V případě potahované tablety, což odpovídá 400 mg ibuprofenu, byla jedna tableta rozpuštěna v 250 ml titrační baňce v asi 20 ml methanolu za pomoci ultrazvukové lázně po dobu 7 minut. Čípek, odpovídající 60 mg ibuprofenu, byl rozpuštěn varem po dobu 3 minut (na vodní lázni) v 50 ml methanolu pod zpětným chladičem. V případě gelu a krému bylo odváženo v obou případech 1,5 g vzorku, což odpovídalo v obou případech 75 mg ibuprofenu, a rozpuštěno varem po dobu 8 minut (na vodní lázni) v 50 ml methanolu pod zpětným chladičem.

Rozpuštěný vzorek byl kvantitativně převeden do 250 ml titrační baňky. Po přidavku 5 kapek fenolftaleinu byl obsah baňky titrován, v případě čípku, gelu a krému z byrety o objemu 25 ml, v případě tablety o objemu 5 ml, odměrným roztokem 0,1M hydroxidu sodného, dokud jediná kapka odměrného roztoku nezměnila zabarvení fenolftaleinu do fialové barvy. Každé stanovení bylo opakováno čtyřikrát.

Vyhodnocení

Pro výpočet obsahu ibuprofenu v analyzovaném vzorku byl použit vzorec

$$w_{IBU} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{c_{NaOH} f_{NaOH} V_{NaOH} M_{IBU}}{m_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.1)$$

kde w_{IBU} je obsah ibuprofenu v analyzovaném vzorku vyjádřený vůči deklarovanému obsahu ibuprofenu [%], m_{nalez} je hmotnost ibuprofenu v analyzovaném vzorku [g/tableta, g/čípek, g/100 g krém, resp. gel], m_{deklar} je výrobcem deklarovaná hmotnost ibuprofenu [g/tableta, g/čípek, g/100 g krém, resp. gel], c_{NaOH} je koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného [mol dm^{-3}], f_{NaOH} je faktor odměrného roztoku hydroxidu sodného, V_{NaOH} je objem odměrného roztoku hydroxidu sodného [dm^{-3}] a M_{IBU} je molekulová hmotnost ibuprofenu [$206,28 \text{ g mol}^{-1}$].

3.3.2 UV spektrofotometrické stanovení ibuprofenu

Příprava roztoků

Roztok standardu ibuprofenu o koncentraci 4 g dm^{-3} byl připraven navážením 0,1000 g standardu ibuprofenu do 25 ml odměrné baňky a doplněním methanolem na objem 25,00 ml.

Stanovení

Ke spektrofotometrickému stanovení ibuprofenu v analyzovaných léčivých přípravcích byl použit jednopaprskový spektrofotometr HP 8453 firmy Hewlett

Packard s diodovým polem, nanometrovým rozlišením od 190 nm do 1100 nm a s křemennými kyvetami o tloušťce 1 cm.

Obsah ibuprofenu v lékových formách byl stanoven pomocí metody standardního přídávku. Potahovaná tableta byla rozpuštěna ve 100 ml odměrné baňce v methanolu pomocí ultrazvukové lázně po dobu 7 minut. V případě gelu a krému byl odvážen 1 g vzorku a ten byl za tepla na vodní lázni rozpuštěn ve 20 ml methanolu, po rozpuštění převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn po rysku methanolem. Čípek byl za tepla na vodní lázni rozpuštěn ve 30 ml methanolu, po rozpuštění převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn po rysku methanolem. Vzorek s čípkem a krémem byl ponechán na 5 minut v chladničce, aby se vyloučil veškerý tuk. Takto připravené roztoky byly přefiltrovány přes filtr MiniSart RC 15 (0,45 μm).

Pro stanovení ibuprofenu metodou standardního přídávku byla připravena koncentrační řada o pěti různých koncentracích. Do 10 ml odměrných baněk bylo odpipetováno 0,25 ml roztoku vzorku v případě tablety a v případě čípku 2,00 ml roztoku vzorku. U gelu a krému byl odpipetován 1,00 ml roztoku vzorku. Od druhé do páté odměrné baňky bylo přidáno vzestupně 0,25 ml, 0,50 ml, 0,75 ml, 1,00 ml roztoku standardu ibuprofenu. Směs v odměrných baňkách byla doplněna po rysku acetonitrem. Vlnová délka absorpčního maxima byla při 264 nm. Měření bylo zopakováno čtyřikrát.

Vyhodnocení

Pro výpočet obsahu ibuprofenu v analyzovaném vzorku bylo využito metody standardního přídávku a následujících vzorců:

a) pro potahovanou tabletu

$$w_{IBU} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{c_{IBU}}{m_{deklar}} \cdot 10 \cdot 400 \cdot 100 \quad (3.2)$$

b) pro krém a gel

$$w_{IBU} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{c_{IBU}}{m_{deklar}} \cdot 10 \cdot 50 \cdot 100 \quad (3.3)$$

c) pro čípek

$$w_{IBU} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{c_{IBU}}{m_{deklar}} \cdot 10 \cdot 25 \cdot 100 \quad (3.4)$$

kde, m_{nalez} je hmotnost ibuprofenu v analyzovaném vzorku [g/tableta, g/čípek, g/100 g krém, resp. gel], m_{deklar} je výrobcem deklarovaná hmotnost ibuprofenu [g/tableta, g/čípek, g/100 g krém, resp. gel], c_{IBU} je koncentrace ibuprofenu v analyzovaném vzorku vyjádřena z rovnice regrese [mg cm^{-3}].

3.3.3 Voltametrické stanovení ibuprofenu

Příprava roztoků

Roztok standardu ibuprofenu o koncentraci 4 g dm^{-3} byl připraven navážením 0,1000 g standardu ibuprofenu do 25 ml odměrné baňky a doplněním methanolem na objem 25 ml.

Roztok základního elektrolytu chloristanu sodného o koncentraci 0,1M byl připraven navážením 1,22 g chloristanu sodného do 100 ml odměrné baňky a doplněním acetonitrem na objem 100 ml.

Stanovení

K voltametrickému stanovení ibuprofenu v různých lékových formách byla použita pracovní rotující disková platinová elektroda ($d = 1,94 \text{ mm}$, $A = 2,96 \text{ mm}^2$), referenční argentchloridová elektroda (E vs. SHE +236,3 mV) a pomocná platinová elektroda. Měření proběhlo na přístroji PalmSens řízeném programem PSTrace.

Obsah ibuprofenu v lékových formách byl stanoven pomocí metody standardního přídávku. Potahovaná tableta byla rozpuštěna ve 100 ml odměrné baňce v methanolu pomocí ultrazvukové lázně po dobu 7 minut. V případě gelu a krému byl odvážen 1 g vzorku a ten byl za tepla na vodní lázni rozpuštěn v 50 ml methanolu. Čípek byl za tepla na vodní lázni rozpuštěn v 50 ml methanolu. Vzorek s čípkem a krémem byl ponechán na 5 minut v chladničce,

aby se vyloučil veškerý tuk. Takto připravené roztoky byly přefiltrovány přes filtr MiniSart RC 15 (0,45 µm).

Pro stanovení ibuprofenu metodou standardního přídavku byla připravena koncentrační řada o pěti různých koncentracích. Do 10 ml odměrných baněk bylo odpipetováno 0,40 ml roztoku vzorku v případě tablety a v případě čípku, gelu a krému 0,50 ml roztoku vzorku. Od druhé do páté odměrné baňky bylo přidáno vzestupně 0,25 ml, 0,40 ml, 0,50 ml, a 0,75 ml roztoku standardu v případě čípku, krému a gelu. V případě tablety bylo přidáno od druhé do páté odměrné baňky vzestupně 0,10 ml, 0,20 ml, 0,30 ml a 0,40 ml roztoku standardu. Směs v odměrných baňkách byla doplněna po rysku roztokem základního elektrolytu 0,1M chloristanem sodným. Připravené roztoky byly převedeny do voltametrické nádoby a následně byl proměřen signál ve formě voltametrické vlny. Po každém měření byly elektrody očištěny buničinou s acetonem a pracovní elektroda byla přeleštěna sametem. Měření bylo zopakováno třikrát. Na elektrody byly vkládány pulsy o šířce 20 ms a modulační amplitudě 50 mV. Rychlost polarizace elektrody byla 5 mV s⁻¹.

Vyhodnocení

Pro výpočet obsahu ibuprofenu v analyzovaném vzorku tablety bylo využito kalibračních závislostí a následujících vzorců:

a) pro potahovanou tabletu

$$w_{IBU} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{c_{IBU}}{m_{deklar}} \cdot 10 \cdot 250 \cdot 100 \quad (3.5)$$

b) pro krém, gel a čípek

$$w_{IBU} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{c_{IBU}}{m_{deklar}} \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100 \quad (3.6)$$

kde w_{IBU} je obsah ibuprofenu v analyzovaném vzorku vyjádřený vůči deklarovanému obsahu ibuprofenu [%], m_{nalez} je hmotnost ibuprofenu v analyzovaném vzorku [g/tableta, g/čípek, g/100 g krém, resp. gel], m_{deklar} je

výrobce deklarovaná hmotnost ibuprofenu [g/tableta, g/čípek, g/100 g krém, resp. gel], c_{IBU} je koncentrace ibuprofenu v analyzovaném vzorku vyjádřena z rovnice regrese [mg cm^{-3}].

3.3.4 Spektrofluorimetrické stanovení ibuprofenu

Příprava roztoků

Roztok amoniaku o koncentraci 0,2M byl připraven odměřením 15 ml 25 % roztoku amoniaku o hustotě $0,91 \text{ g cm}^{-3}$ a doplněním na objem 1 l destilovanou vodou.

Roztok standardu ibuprofenu o koncentraci $0,125 \text{ g dm}^{-3}$ byl připraven navážením 0,1250 g standardu ibuprofenu do 1 l odměrné baňky a doplněním 0,2M roztokem amoniaku na objem 1 l.

Stanovení

K spektrofotometrickému stanovení ibuprofenu v různých lékových formách byl použit luminiscenční spektrofluorimetr Aminco Bowman Series 2 řízený programem AB2 ver. 5.50 (obé Thermo Spectronic). K měření byla použita křemenná kyveta s vnitřními rozměry $1 \times 1 \text{ cm}$ v pravoúhlém uspořádání.

Potahovaná tableta byla rozpuštěna ve 100 ml odměrné baňce v 0,2M roztoku amoniaku za pomoci ultrazvukové lázně po dobu 7 minut. V případě krému a gelu byl odvážen 1 g vzorku a ten byl za tepla na vodní lázni rozpuštěn ve 20 ml 0,2M roztoku amoniaku, po rozpuštění převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn po rysku 0,2M roztokem amoniaku. Čípek byl za tepla na vodní lázni rozpuštěn ve 30 ml 0,2M roztoku amoniaku, po rozpuštění převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn po rysku 0,2M roztokem amoniaku. Vzorek s čípkem a krémem byl ponechán na 5 minut v chladničce, aby se vyloučil veškerý tuk. Takto připravené roztoky byly přefiltrovány přes filtr MiniSart RC 15 ($0,45 \mu\text{m}$). U vzorku krému se nepodařilo roztok přefiltrovat na čirý roztok, nebylo tedy možné stanovení provést.

Byla použita metoda kalibrační přímky, pro kterou byla připravena koncentrační řada o šesti různých koncentracích, 5 mg dm^{-3} , 10 mg dm^{-3} ,

25 mg dm⁻³, 45 mg dm⁻³, 65 mg dm⁻³ a 75 mg dm⁻³. Do 5 ml odměrných baněk bylo odpipetováno vzestupně 0,20 ml, 0,40 ml, 1,00 ml, 1,80 ml, 2,60 ml a 3,00 ml roztoku standardu. Obsah odměrných baněk byl doplněn po rysku 0,2M roztokem amoniaku. Excitační vlnová délka byla při 272 nm, emise záření byla měřena při 287 nm. Měření bylo zopakováno čtyřikrát.

Pro jednotlivé lékové formy byly připraveny vzorky do 10 ml odměrných baněk, v případě tablety bylo odpipetováno 0,10 ml vzorku, v případě gelu 0,4 ml vzorku a v případě čípku 0,25 ml vzorku. Odměrné baňky byly doplněny po rysku 0,2M roztokem amoniaku. Vzorky byly rovněž proměřeny.

Vyhodnocení

Pro výpočet obsahu ibuprofenu v analyzovaném vzorku tablety bylo využito kalibračních závislostí a následujících vzorců:

a) pro potahovanou tabletu

$$w_{IBU} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{c_{IBU}}{m_{deklar}} \cdot 0,01 \cdot 1000 \cdot 100 \quad (3.7)$$

b) pro gel a krém

$$w_{IBU} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{c_{IBU}}{m_{deklar}} \cdot 0,01 \cdot 125 \cdot 100 \quad (3.8)$$

c) pro čípek

$$w_{IBU} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{c_{IBU}}{m_{deklar}} \cdot 0,01 \cdot 200 \cdot 100 \quad (3.9)$$

kde w_{IBU} je obsah ibuprofenu v analyzovaném vzorku vyjádřený vůči deklarovanému obsahu ibuprofenu [%], m_{nalez} je hmotnost ibuprofenu v analyzovaném vzorku [g/tableta, g/čípek, g/100 g krém, resp. gel], m_{deklar} je výrobcem deklarovaná hmotnost ibuprofenu [g/tableta, g/čípek, g/100 g krém,

resp. gel], c_{IBU} je koncentrace ibuprofenu v analyzovaném vzorku vyjádřena z rovnice regrese [mg dm^{-3}].

3.4 Statistické zpracování naměřených hodnot

Statistické zpracování naměřených hodnot bylo provedeno klasickými statistickými postupy na hladině významnosti 0,95 [28]. U dat získaných při jednotlivých stanovení bylo provedeno zjištění případné odlehlosti výsledků pomocí Deanova-Dixonova testu. Konečné výsledky jsou dány jako medián s intervalem spolehlivosti.

Grafy a statistické výpočty byly zpracovány pomocí softwarových programů OriginPro 6.0 (Microcal Software, USA) a Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA).

4 Výsledky a diskuze

4.1 Acidobazická titrace ibuprofenu

Stanovení ibuprofenu metodou acidobazické titrace s vizuální indikací konce titrace bylo provedeno u všech lékových forem. U každé lékové formy bylo stanovení provedeno čtyřikrát. Po provedení Deanova-Dixonova testu nebylo zjištěno, že by byl některý výsledek odlehlý. V tabulce 4.1 jsou uvedeny spotřeby odměrného roztoku hydroxidu sodného, podle známe stechiometrie vypočítané hmotnosti ibuprofenu ve vzorku a obsahy ibuprofenu v analyzovaných vzorcích v procentech deklarovaného obsahu.

V analyzovaném vzorku potahované tablety byl stanoven obsah ibuprofenu v procentech deklarovaného obsahu na $102,4 \pm 0,4$ %, v analyzovaném vzorku čípku na $105,9 \pm 0,9$ %, v analyzovaném vzorku krému na $106,5 \pm 0,4$ % a v analyzovaném vzorku gelu na $115,6 \pm 0,6$ %.

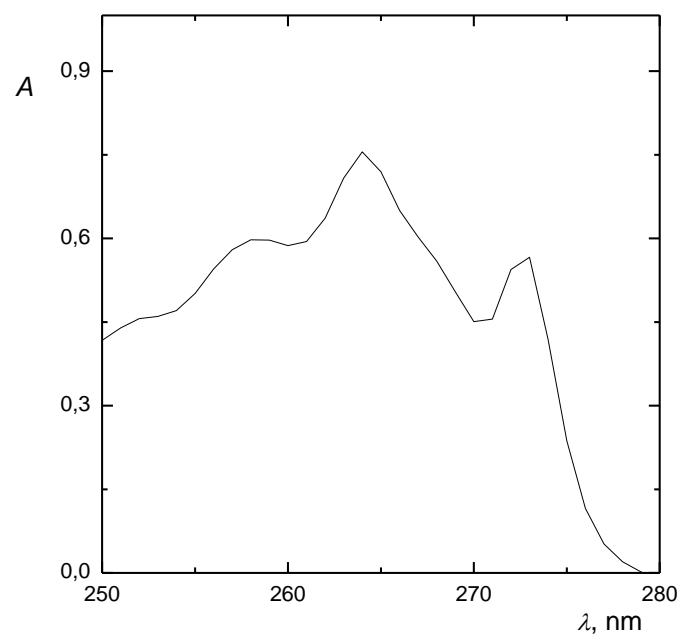
Tab. 4.1 Výsledky stanovení obsahu ibuprofenu v analyzovaných lékových formách metodou acidobazické titrace s vizuální indikací konce titrace: spotřeba 0,1M odměrného roztoku hydroxidu sodného ($f = 1,005$), odpovídající hmotnost ibuprofenu a vypočítaný obsah ibuprofenu v analyzovaném vzorku vůči deklarované hodnotě.

vzorek	stanovení	V_{NaOH} [ml]	m_{IBU} [mg]	w_{IBU} [%]
Brufen 400 mg	1.	19,80	410,5	102,6
	2.	19,80	410,5	102,6
	3.	19,70	408,4	102,1
	4.	19,70	408,4	102,1
Nurofen 60 mg/čípek	1.	3,05	63,2	105
	2.	3,08	63,9	106
	3.	3,08	63,9	106
	4.	3,05	63,2	105
Dolgit krém 5 g/100 g	1.	3,97	82,3	107
	2.	3,97	82,3	107
	3.	3,95	81,8	106
	4.	3,95	81,8	106
Dolgit gel 5 g/100 g	1.	4,20	87,1	115
	2.	4,21	87,3	115
	3.	4,23	87,7	116
	4.	4,21	87,3	115

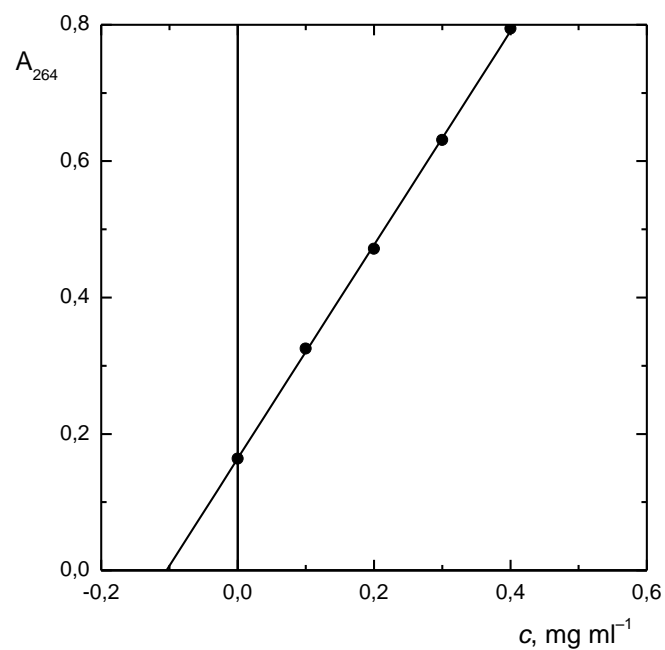
4.2 UV spektrofotometrické stanovení ibuprofenu

Před vlastním stanovením bylo proměřeno UV spektrum standardu ibuprofenu (obr. 4.1), z něhož bylo pro další měření zvoleno absorpční maxima při vlnové délce 264 nm.

Stanovení ibuprofenu pomocí UV spektrofotometrie metodou standardního přídatku bylo provedeno u všech lékových forem. U každé lékové formy bylo toto stanovení provedeno čtyřikrát. Na obr. 4.2 je znázorněna závislost absorbance při 264 nm na koncentraci standardního přídatku ibuprofenu při spektrofotometrickém stanovení obsahu ibuprofenu ve vzorku gelu.



Obr. 4.1 UV spektrum ibuprofenu v prostředí acetonitrilu ($c = 0,54 \text{ mg ml}^{-1}$, $l = 1 \text{ cm}$).



Obr. 4.2 Závislost absorpance při vlnové délce 264 nm na koncentraci standardního přídatku ibuprofenu při spektrofotometrickém stanovení obsahu ibuprofenu ve vzorku Dolgit gelu.

V tabulce 4.2 jsou uvedeny koncentrace získané z kalibračních přímk, vypočítané hmotnosti ibuprofenu v analyzovaném vzorku a obsahy ibuprofenu v analyzovaných vzorcích v procentech deklarovaného obsahu. Po provedení Deanova-Dixonova testu nebylo zjištěno, že by byl některý z výsledků odlehlý. Po statistickém zpracování naměřených hodnot byl v analyzovaném vzorku potahované tablety stanoven obsah ibuprofenu v procentech deklarovaného obsahu na $90,9 \pm 4,9$ %, v analyzovaném vzorku čípku na $93,4 \pm 2,5$ %, v analyzovaném vzorku krému na 105 ± 12 % a v analyzovaném vzorku gelu na 108 ± 6 %.

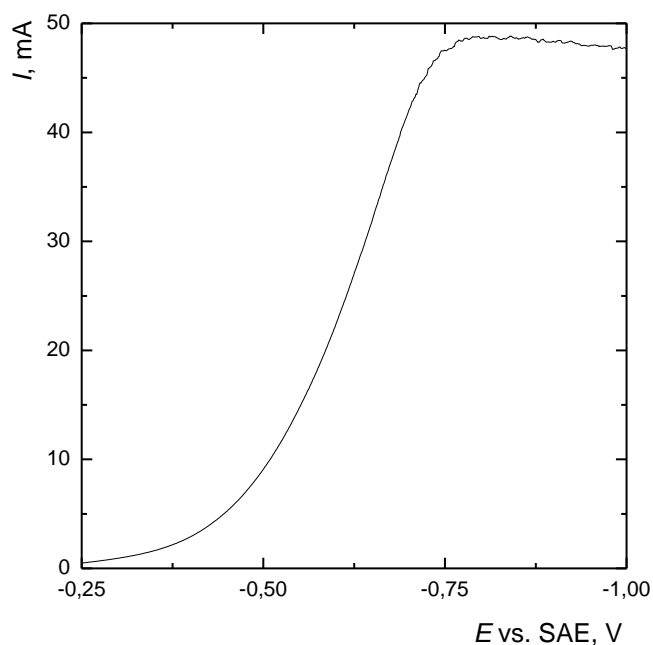
Tab. 4.2 Výsledky stanovení ibuprofenu v analyzovaných léčivých přípravcích pomocí UV spektrofotometrie. Změřená koncentrace ibuprofenu při metodě standardního přídávku, vypočítaná hmotnost ibuprofenu v analyzovaném vzorku a obsah ibuprofenu v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

vzorek	stanovení	c_{IBU} [$\mu\text{g/ml}$]	m_{IBU} [mg]	w_{IBU} [%]
Brufen 400 mg	1.	90,89	363,6	90,89
	2.	88,93	355,7	88,94
	3.	90,85	363,4	90,85
	4.	95,82	383,3	95,83
Nurofen 60 mg/čípek	1.	227,2	56,87	94,68
	2.	227,2	56,87	94,68
	3.	219,1	54,77	91,27
	4.	221,0	55,26	92,10
Dolgit krém 5 g/100 g	1.	191,9	48,31	96,62
	2.	201,8	50,15	103,0
	3.	214,4	53,26	106,5
	4.	223,9	56,42	112,8
Dolgit gel 5 g/100 g	1.	104,4	52,16	104,3
	2.	113,3	56,64	113,3
	3.	109,0	54,50	109,0
	4.	108,1	54,06	108,1

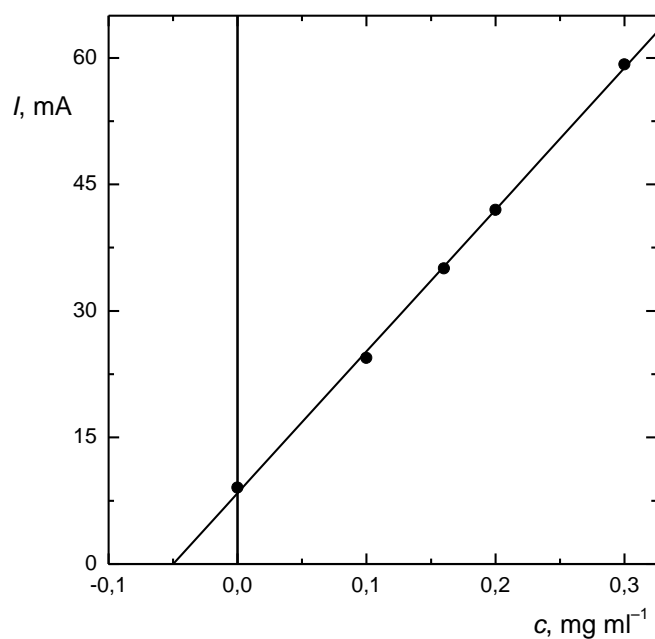
4.3 Voltametrické stanovení ibuprofenu

Stanovení ibuprofenu pomocí voltametrie metodou standardního přídávku bylo provedeno u všech lékových forem. U každé lékové formy bylo toto stanovení provedeno třikrát.

Na obr. 4.3 je uveden voltamogram analyzovaného vzorku krému. Na obr. 4.4 je graficky znázorněna závislost velikosti proudu na koncentraci standardního přídávku ibuprofenu při voltametrickém stanovení obsahu ibuprofenu v analyzovaném vzorku krému.



Obr. 4.3 Diferenční pulzní voltamogram ibuprofenu v analyzovaném vzorku krému s přídávkem standardu ibuprofenu v prostředí 0,1M chloristanu sodného v acetonitrilu ($c_{\text{standard}} = 0,2 \text{ mg ml}^{-1}$, $d = 1,94 \text{ mm}$, E vs. E_{SAE}).



Obr. 4.4 Závislost velikosti proudu voltametrického píku ibuprofenu na koncentraci standardního přídávku ibuprofenu při voltametrickém stanovení obsahu ibuprofenu ve vzorku Dolgit krém.

V tabulce 4.3 jsou uvedeny koncentrace získané z kalibračních přímk, vypočítané hmotnosti ibuprofenu v analyzovaném vzorku a obsahy ibuprofenu v analyzovaných vzorcích v procentech deklarovaného obsahu. Po provedení Deanova-Dixonova testu nebylo zjištěno, že by byl některý z výsledků odlehlý. Po statistickém zpracování naměřených hodnot byl v analyzovaném vzorku potahované tablety stanoven obsah ibuprofenu v procentech deklarovaného obsahu na $94,6 \pm 8,2$ %, v analyzovaném vzorku čípku na $97,7 \pm 3,1$ %, v analyzovaném vzorku krému na 108 ± 13 % a v analyzovaném vzorku gelu na $98,2 \pm 4,8$ %.

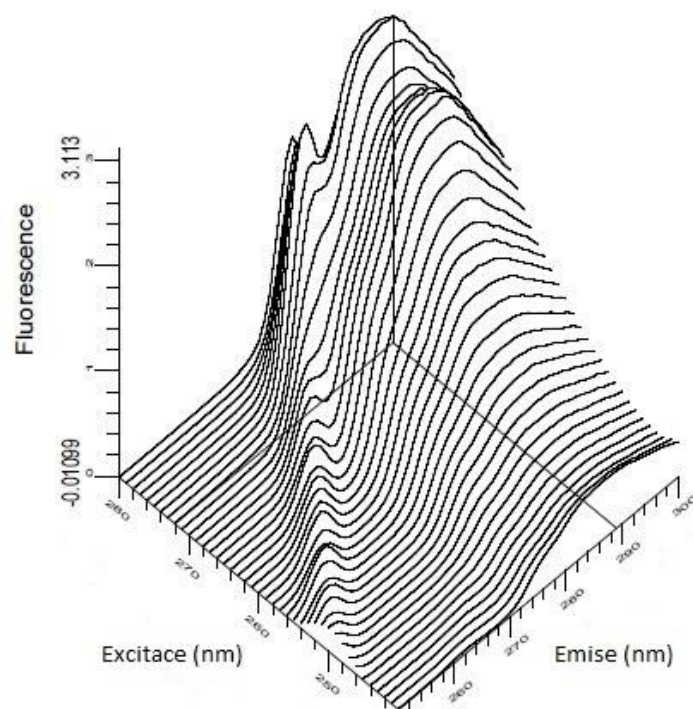
Tab. 4.3 Výsledky stanovení ibuprofenu v lékových formách pomocí voltametrie. Změřená koncentrace ibuprofenu při metodě standardního přídávku, vypočítaná hmotnost ibuprofenu v analyzovaném vzorku a obsah ibuprofenu v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

vzorek	stanovení	c_{IBU} [mg/ml]	m_{IBU} [mg]	w_{IBU} [%]
Brufen 400 mg	1.	154	386	96,6
	2.	151	378	94,6
	3.	144	360	90,2
Nurofen 60 mg/čípek	1.	59,8	59,8	99,7
	2.	58,6	58,6	97,7
	3.	58,4	58,4	97,3
Dolgit krém 5 g/100 g	1.	54,2	54,1	108
	2.	54,8	54,8	109
	3.	50,0	50,0	100
Dolgit gel 5 g/100 g	1.	50,3	50,4	101
	2.	49,0	49,1	98,2
	3.	48,4	48,5	97,1

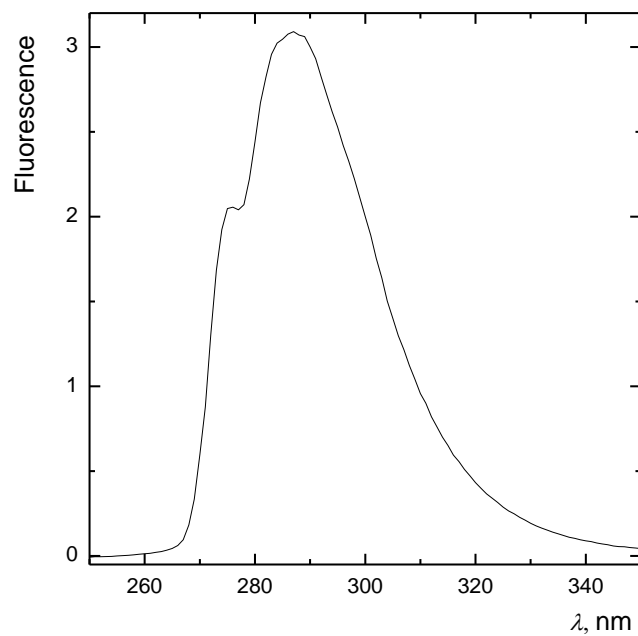
4.4 Spektrofluorimetrické stanovení ibuprofenu

Stanovení ibuprofenu pomocí spektrofluorimetrie metodou kalibrační přímky bylo možné provést jen u tří lékových forem, a to u gelu, tablety a čípku. U každé lékové formy bylo toto stanovení provedeno čtyřikrát.

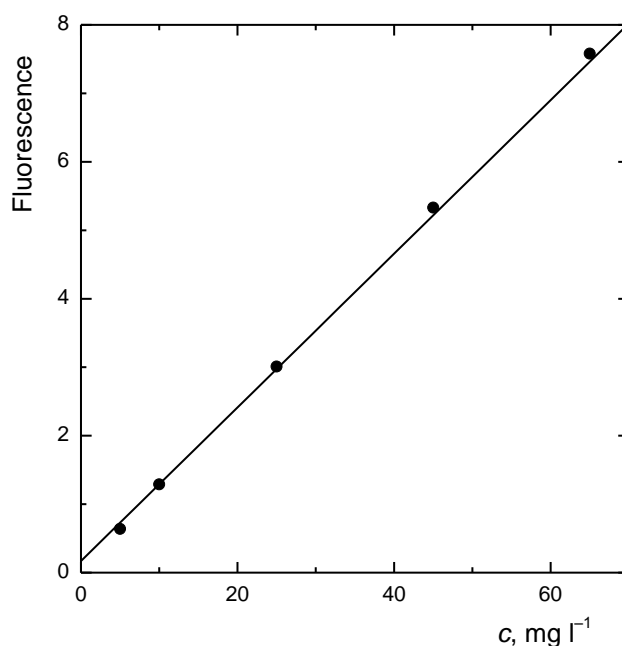
Před vlastním stanovením bylo provedeno změření optimální excitační a emisní vlnové délky pro stanovení, proměřením roztoku standardu ibuprofenu v 0,2M roztoku amoniaku v rozsahu excitačních vlnových délek od 240 nm do 280 nm a emisních vlnových délek od 250 nm do 300 nm; získané 3D spektrum je zobrazeno na obr. 4.5. Z tohoto měření byla pro stanovení zvolena excitační vlnová délka 272 nm a emisní vlnová délka při 287 nm. Obr. 4.6 znázorňuje emisní spektrum ibuprofenu v analyzovaném vzorku tablety s přídávkem standardu ibuprofenu v prostředí 0,2M amoniaku. Příklad kalibrační přímky pro stanovení ibuprofenu v analyzovaném vzorku tablety Brufen je uveden na obr. 4.7.



Obr. 4.5 Závislost relativní fluorescence na vlnových délkách excitace, resp. emise, pro roztok standardu ibuprofenu v 0,2M roztoku amoniaku ($c = 25 \text{ mg dm}^{-3}$).



Obr. 4.6 Emisní spektrum ibuprofenu v analyzovaném vzorku tablety s přidavkem standardu ibuprofenu v prostředí 0,2M amoniaku ($\lambda_{\text{ex}} = 272 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 287 \text{ nm}$, $c = 25 \text{ mg dm}^{-3}$, $l = 1 \text{ cm}$).



Obr. 4.7 Závislost relativní fluorescence na koncentraci standardního přídávku ibuprofenu při spektrofluorimetrickém stanovení ibuprofenu ve vzorku tablety Brufen ($\lambda_{\text{ex}} = 272 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 287 \text{ nm}$, $l = 1 \text{ cm}$).

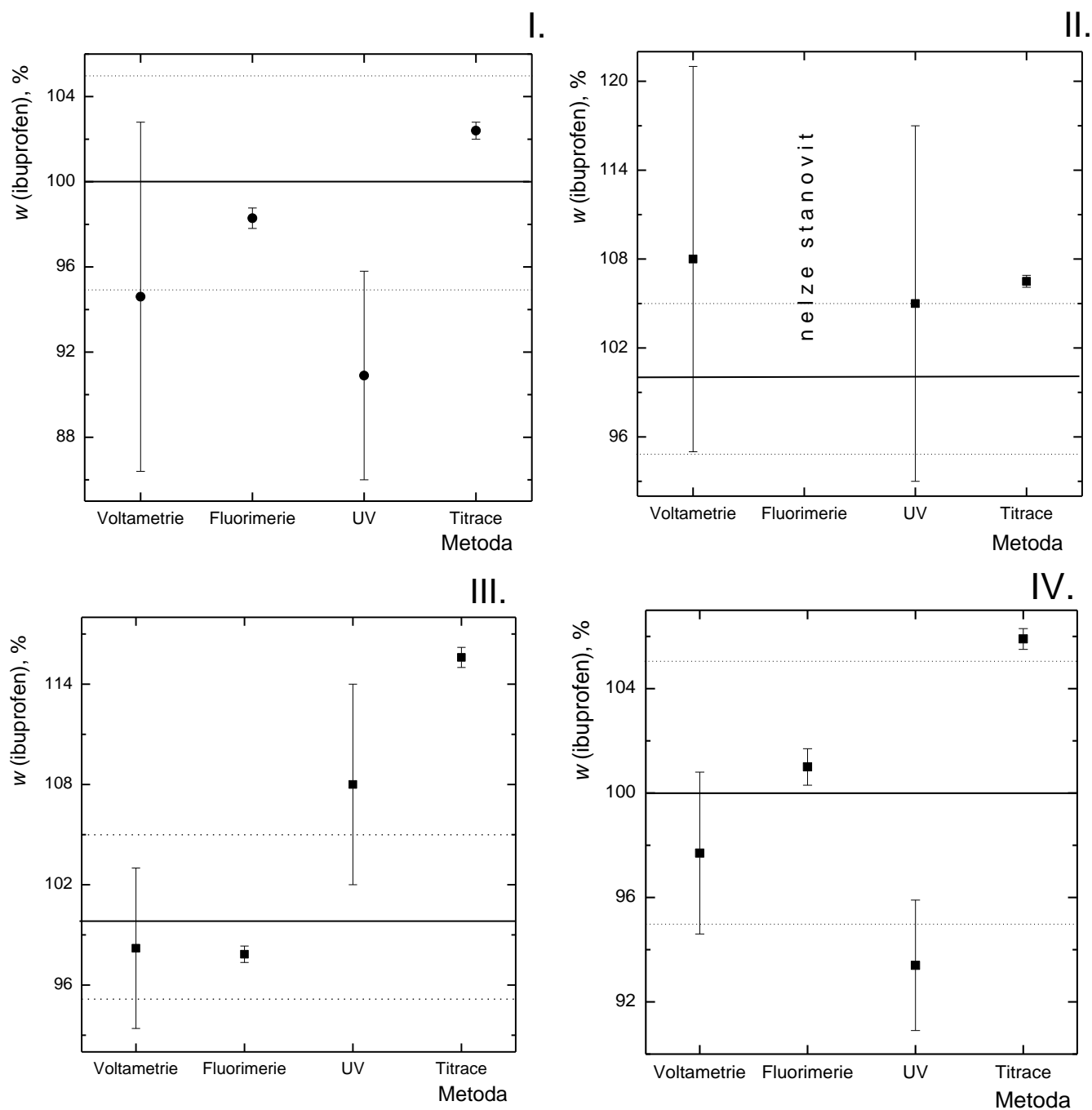
V tabulce 4.4 jsou uvedeny koncentrace získané z kalibračních přímk, vypočítané hmotnosti ibuprofenu v analyzovaném vzorku a obsahy ibuprofenu v analyzovaných vzorcích v procentech deklarovaného obsahu. Po provedení Deanova-Dixonova testu nebylo zjištěno, že by byl některý z výsledků odlehlý. Po statistickém zpracování naměřených hodnot bylo zjištěno, že v analyzovaném vzorku potahované tablety byl stanoven obsah ibuprofenu v procentech deklarovaného obsahu na $98,29 \pm 0,48 \%$, v analyzovaném vzorku čípku na $101,4 \pm 0,7 \%$, v analyzovaném vzorku gelu na $97,84 \pm 0,49 \%$. V analyzovaném vzorku krému obsahu ibuprofenu nebylo možno stanovit.

Tab. 4.4 Výsledky stanovení ibuprofenu v lékových formách pomocí spektrofotometrie. Změřená koncentrace ibuprofenu metodou kalibrační přímky, vypočítaná hmotnost ibuprofenu v analyzovaném vzorku a obsah ibuprofenu v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

vzorek	stanovení	c_{IBU} [$\mu\text{g/ml}$]	m_{IBU} [mg]	w_{IBU} [%]
Brufen 400 mg	1.	39,32	393,2	98,29
	2.	39,41	394,1	98,52
	3.	39,32	393,2	98,29
	4.	39,14	391,4	97,85
Nurofen 60 mg/čípek	1.	30,59	61,18	101,9
	2.	30,29	60,58	101,0
	3.	30,56	60,92	101,5
	4.	30,35	60,70	101,2
Dolgit gel 5 g/100 g	1.	39,09	48,87	97,73
	2.	39,18	48,98	97,95
	3.	39,27	49,08	98,16
	4.	38,99	48,74	97,48

4.5 Vyhodnocení pravdivosti, preciznosti, finanční a časové náročnosti vybraných metod

Jelikož v analyzovaných lékových formách není přesně definovaný obsah ibuprofenu, byla pravdivost stanovení porovnávány analytickými metodami pro jednotlivé lékové formy zpracována pouze graficky na obr. 4.8. Podle *Českého lékopisu 2009* [12] se obsah ibuprofenu v lékových formách může pohybovat v rozmezí od 95,0–105,0 %. Na obr. 4.8 je rovněž graficky znázorněno porovnání preciznosti výsledků jednotlivých metod stanovení zobrazením mediánu s intervalem spolehlivosti.



Obr. 4.8 Grafické porovnání výsledků vybraných analytických metod voltametrie, spektrofotometrie, UV spektrofotometrie a acidobazické titrace pro stanovení ibuprofenu v analyzovaných léčivých přípravcích (I.) potahovaná tableta, (II.) krém, (III.) gel a (IV.) čípky. Výsledky jsou vyjádřeny jako mediány s intervalem spolehlivosti. Silná čára vyznačuje deklarovaný obsah ibuprofenu v léčivém přípravku, slabá pak dolní a horní mez obsahu ibuprofenu podle Českého lékopisu 2009.

Z obr. 4.8 vyplývá, že nejpreciznější hodnoty poskytla acidobazická titrace a spektrofluorimetrie, navíc intervaly spolehlivosti pro spektrofluorimetrické stanovení jsou zcela v povoleném rozmezí obsahu ibuprofenu v lékových formách. Nejméně precizní, avšak pravdivé bylo voltametrické a UV spektrofotometrické stanovení. Výsledky acidobazické titrace se neshodují s deklarovanou hodnotou (resp. Leží mimo povolené rozmezí obsahu ibuprofenu v lékových formách), pravdivost acidobazické titrace byla zřejmě zatížena subjektivní chybou - vizuální indikace konce titrace. Také je pravděpodobné, že lékové preparáty obsahují kyselou složku, která stanovení nadohodnocuje.

Do finanční náročnosti použitých metod byly započítány finanční náklady na chemikálie potřebné ke stanovení jednoho vzorku a pořizovací cena analyzovaných vzorků, nebyly započítány pořizovací ceny instrumentálního vybavení. Ceny chemikálií byly použity z ceníků prodejců chemikálií [30]. Časová náročnost daných metod odpovídá průměrné době, která je potřebná k provedení celé analýzy jednoho vzorku, tedy doba od navážení vzorku až po výpočet obsahu ibuprofenu. Do celkové časové bilance není zahrnut čas pro přípravu pomocných nebo odměrných roztoků, standardizaci roztoku a přípravu kalibračních roztoků. Finanční i časové bilance použitých metod jsou uvedeny v tabulce 4.5.

Tab. 4.5 Časová a finanční náročnost jednotlivých metod pro stanovení obsahu ibuprofenu v analyzovaných lékových formách.

Metoda	léková forma	časová náročnost [min]	finanční náročnost [Kč]
acidobazická titrace	potahovaná tableta	12	20
	čípek, krém, gel		45
UV spektrofotometrie	potahovaná tableta	30	130
	čípek, krém, gel		80
voltametrie	potahovaná tableta	60	140
	čípek, krém, gel		90
spektrofluorimetrie	potahovaná tableta, gel	30	10
	čípek		

Finančně nejvýhodnější je spektrofluorimetrie, naopak nejnákladnější je voltametrické stanovení z důvodu použití chloristanu sodného, který je rozpuštěn v acetonitrilu. Časově nejnáročnější je také voltametrické stanovení, z důvodu četnosti měření a délky analýzy. Naopak časově nejvýhodnější je acidobazická titrace.

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo porovnání a zhodnocení čtyř analytických metod pro stanovení ibuprofenu ve čtyřech lékových formách z hlediska jejich časové a finanční náročnosti, pravdivosti a preciznosti.

Pro stanovení ibuprofenu byly vybrány čtyři analytické metody: acidobazická titrace s vizuální indikací konce titrace, UV spektrofotometrie, voltametrie a spektrofluorimetrie. Nejpreciznější hodnoty poskytla acidobazická titrace a spektrofluorimetrie. Naopak nejméně precizní bylo voltametrické stanovení u vzorku potahované tablety Brufen a UV spektrofotometrické a voltametrické stanovení u vzorku Dolgit krému. Výsledky spektrofluorimetrického stanovení, voltametrického stanovení a UV spektrofotometrického stanovení se shodly s deklarovanou hodnotou, resp. povoleným rozmezím obsahu ibuprofenu v lékových formách. Z finančního hlediska byla nejvýhodnější spektrofluorimetrie, naopak nejnákladnější bylo voltametrické stanovení. Časově nejnáročnější bylo voltametrické stanovení, na druhou stranu pak nejrychlejší metodou byla acidobazická titrace.

Literatura

- [1] Hynie, S.: *Speciální farmakologie. Díl 2.* Praha, Karolinum 1998.
- [2] Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J.: *Farmakochemie.* 2.vyd. Praha, VŠCHT 2007.
- [3] *Ibuprofen, A Critical Bibliographic Review.* K.D. Rainsford (ed.). Taylor & Francis 1999.
- [4] *British Pharmacopoeia 2009.* London, British Pharmacopoeia Commission Office 2008.
- [5] Wechter, W. J.: Drug chirality: On the mechanism of R-aryl propionic acid class NSAIDs. Epimerization in humans and the clinical implications for the use of racemates. *Journal of Clinical Pharmacology* **34**:11, 1036–1042 (1994).
- [6] Doležal, M. a kol.: *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém.* Praha, Karolinum 2013.
- [7] US Patent 3385886 (1968). Nicholson, J.S.; Adams, S.S.: *Phenyl propionic acids.*
- [8] Kjonas, R.A.; Williams, P.E.; Counce, D.A.; Crawley L.R.: Synthesis of ibuprofen in the introductory organic laboratory. *Journal of Chemical Education* **88**:6, 825–830 (2011).
- [9] Periasamy, M.; Shaik A.; Meda Nasi R.: Simple and convenient methods for synthesis, resolution and application of aminonaphthols. *Indian Journal of Chemistry B* **48**:9, 1261–1273 (2009).
- [10] Al Shaye N.; Chavda, S.; Coulbeck E.; Eames J.; Yohannes, Y.: Efficient parallel resolution of pentafluorophenyl active esters using quasi-enantiomeric combinations of oxazolidin-2-ones. *Tetrahedron: Asymmetry* **22**:4, 439–463 (2011).
- [11] Svoboda, J.; Čapek, K.; Paleček, J.: Esters of arylpropionic acids with 1,2:5,6-di-O-isopropylidene- and 1,2-O-isopropylidene- α -D-glucopyranose. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **52**:3, 766–774 (1987).
- [12] *Český lékopis 2009.* Praha, Grada 2009.
- [13] Caviglioli, G.; Valeria, P.; Brunella, P.: Identification of degradation products of ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **30**:3, 499–509 (2002).
- [14] Rainsford, K. D.: *Ibuprofen. Pharmacology, Therapeutics and Side Effects.* Basel, Springer 2012.
- [15] Marek, J. a kol.: *Farmakoterapie vnitřních nemocí.* 4. vyd. Praha, Grada 2010.
- [16] Pavelka, K. a kol.: *Farmakoterapie revmatických onemocnění.* Praha, Grada 2005.
- [17] <<http://www.sukl.cz/>> (cit. 10.2.2015)
- [18] Ševela, K.; Ševčík, P. a kol.: *Akutní intoxikace a léková poškození v intenzivní medicíně.* 2. vyd., Praha, Grada 2011.
- [19] Matkovic, S. R.; Valle, G. M.; Briand, L. E.: Quantitative analysis of ibuprofen in pharmaceutical formulations through FTIR spectroscopy. *Latin American Applied Research* **35**, 189–196 (2005).

- [20] Hansen, S. H.; Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K. E.: *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis*. Wiley 2012.
- [21] Kowalska, T.; Sherma, J.: *Thin Layer Chromatography in Chiral Separations and Analysis*. Taylor & Francis 2007.
- [22] Hillerström A.; van Stam, J.; Andersson M.: Ibuprofen leading into mesostructured silica using liquid carbon dioxide as a solvent. *Green Chemistry* **11**:5, 662–667 (2009).
- [23] Lima, A.B.; Torres, L.M.F.C.; Guimaraes, C.F.R.C.; Verly, R.M.; da Silva, L.M.; Júnior, Á.D.C., dos Santos, W.T.P.: Simultaneous determination of paracetamol and ibuprofen in pharmaceutical samples by differential pulse voltammetry using a boron-doped diamond electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **25**:3, 478–483 (2014).
- [24] Motoc, S.; Remes, A.; Pop, A.; Manea, F.; Schoonman, J.: Electrochemical detection and degradation of ibuprofen from water on multi-walled carbon nanotubes-epoxy composite electrode. *Journal of Environmental Sciences* **25**:4, 837–847 (2013).
- [25] Sunaric, S.; Petkovic, M.; Denic, M.; Mitic, S.; Pavlovic, A.: Determination of ibuprofen in combined dosage forms and cream by direct UV spectrophotometry after solid-phase extraction. *Acta Poloniae Pharmaceutica* **70**:3, 403–411 (2013).
- [26] Harvey D.: *Modern Analytical Chemistry*. McGraw-Hill 2000.
- [27] Kanoute, G.; Nivaud, E.; Boucly, P.; Guernet, M.: Electrochemical reduction of phenylpropionic acid derivatives having antiinflammatory activity. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1–2**:1 (1984), 49–54. *CA* **101**:45335.
- [28] Damiani, P. C.; Bearsotti, M.; Cabezon N. A.: Spectrofluorimetric determination of ibuprofen in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **25**:3–4, 679–683 (2001).
- [29] Miller, J. N.; Miller, J. C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical chemistry*. 5th Ed. Harlow, Pearson Education 2005.
- [30] <<http://www.lach-ner.com/>>; <<http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>>; <<http://www.thermofisher.cz/>> (cit. 22.4.2015)